

12.11.99

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

EPO

JP 99 / 6322

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年11月19日

REC'D 06 JAN 2000

WIPO PCT

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第347863号

出 願 人
Applicant (s):

財団法人化学及血清療法研究所

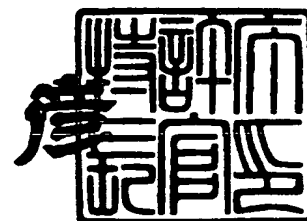
09/856199

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年12月17日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-3087671

【書類名】 特許願

【整理番号】 P10-008

【提出日】 平成10年11月19日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志殿

【国際特許分類】 A61K 37/48

【発明の名称】 細胞死抑制活性を有するペプチド断片

【請求項の数】 15

【発明者】

 【住所又は居所】 熊本県菊池郡西合志町須屋 2 6 2 9 - 5

 【氏名】 平嶋 正樹

【発明者】

 【住所又は居所】 熊本県熊本市壺川 1 丁目 1 - 1 2 栄久ハイツ

 【氏名】 前田 浩明

【発明者】

 【住所又は居所】 熊本県熊本市武蔵ヶ丘 5 丁目 2 6 - 1

 【氏名】 野崎 周英

【特許出願人】

 【識別番号】 000173555

 【住所又は居所】 熊本県熊本市大窪一丁目 6 番 1 号

 【氏名又は名称】 財団法人化学及血清療法研究所

 【代表者】 酒匂 光郎

【手数料の表示】

 【納付方法】 予納

 【予納台帳番号】 056568

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 要約書 1

 【物件名】 図面 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞死抑制活性を有するペプチド断片

【特許請求の範囲】

【請求項1】 セレノプロテインPのC末端側103アミノ酸配列または当該アミノ酸配列のうち1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列または前記いずれかのアミノ酸配列の部分配列を有する、細胞死抑制活性を有するペプチド断片またはペプチド断片群。

【請求項2】 次式(I): Lys Arg Cys Ile Asn Gln
Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu
Leu Ala Pro Arg Ser X Cys Cys His Cys
Arg His Leu および/または

(II): Thr Gly Ser Ala Ile Thr
X Gln Cys Lys Glu Asn Leu Pro Ser Leu
Cys Ser X Gln Gly Leu Arg Ala Glu Glu
Asn Ile (式中Alaはアラニン、Argはアルギニン、Asnはアスパラギン、Aspはアスパラギン酸、Cysはシステイン、Glnはグルタミン、Gluはグルタミン酸、Glyはグリシン、Hisはヒスチジン、Ileはイソロイシン、Lysはリジン、Leuはロイシン、Metはメチオニン、Pheはフェニルアラニン、Proはプロリン、Serはセリン、Thrはトレオニン、Trpはトリプトファン、Tyrはチロシン、Valはバリン及びXはセレノシステインの各残基をそれぞれ表す)で表されるアミノ酸配列もしくは当該アミノ酸配列の部分配列を有する、請求項1記載のペプチド断片またはペプチド断片群。

【請求項3】 血漿蛋白質に由来する請求項1または請求項2に記載のペプチド断片またはペプチド断片群。

【請求項4】 (a)分子量分画膜に基づき10~30kDaの分子量画分に回収され、(b)イオン交換樹脂への結合性の検討の結果、血中でpH7からpH8の間に等電点を示す構造とpH8以上に等電点を示す構造を有し、(c)非還元系SDS-PAGEでは分子量13~14kDaの2本のバンド及びそれらに糖鎖の付加された16~17kDaの2本のバンドを示し、また(d)還元条件下で

の SDS-PAGE では、前記バンドに加えて 3～4 kDa、7～9 kDa 及び 10～12 kDa のバンドを呈する、請求項 1 から請求項 3 のいずれかに記載のペプチド断片またはペプチド断片群。

【請求項 5】 還元条件下での SDS-PAGE において、3～4 kDa、7～9 kDa 及び 10～12 kDa のバンドに相当する、請求項 1 から請求項 4 のいずれかに記載のペプチド断片またはペプチド断片群

【請求項 6】 請求項 1 から請求項 5 のいずれかに記載の細胞死抑制活性を有するペプチド断片またはペプチド断片群を主要構成成分とする、細胞死が関与する疾患の病態悪化阻止、予防または治療剤。

【請求項 7】 前記細胞死が関与する疾患が、AIDS、パーキンソン病、アルツハイマー病、動脈硬化、心筋梗塞、脳梗塞、臓器移植等再灌流傷害より選択される、請求項 6 記載の病態悪化阻止、予防または治療剤。

【請求項 8】 請求項 1 から請求項 5 のいずれかに記載の細胞死抑制活性を有するペプチド断片またはペプチド断片群を主要構成成分とする、酸化還元反応が関与する疾患の病態悪化阻止、予防または治療剤。

【請求項 9】 請求項 1 から請求項 5 のいずれかに記載の細胞死抑制活性を有するペプチド断片またはペプチド断片群を主要構成成分とする、免疫系細胞が関与する疾患の病態悪化阻止、予防または治療剤。

【請求項 10】 請求項 1 から請求項 5 のいずれかに記載の細胞死抑制活性を有するペプチド断片またはペプチド断片群を主要構成成分とする、細胞培養用添加剤。

【請求項 11】 0.01～0.5% アルブミン添加無血清培地を用いたヒト巨核芽球系細胞培養系における細胞突然死現象を利用し、細胞死抑制活性を有する物質を添加してその際の細胞死抑制の程度を評価する、細胞死抑制活性のスクリーニング方法。

【請求項 12】 セレノプロテイン P の C 末端側 103 アミノ酸配列または当該アミノ酸配列のうち 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列または前記いずれかのアミノ酸配列の部分配列からなる、細胞死抑制活性を有するペプチド断片またはペプチド断片群に対する抗体。

【請求項13】 ペプチド断片またはペプチド断片群が

次式(I): Lys Arg Cys Ile Asn Gln
Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu
Leu Ala Pro Arg Ser X Cys Cys His Cys
Arg His Leu および/または

(II): Thr Gly Ser Ala Ile Thr
X Gln Cys Lys Glu Asn Leu Pro Ser Leu
Cys Ser X Gln Gly Leu Arg Ala Glu Glu
Asn Ile (式中Alaはアラニン、Argはアルギニン、Asnはアスパラ
ギン、Aspはアスパラギン酸、Cysはシステイン、Glnはグルタミン、G
luはグルタミン酸、Glyはグリシン、Hisはヒスチジン、Ileはイソロ
イシン、Lysはリジン、Leuはロイシン、Metはメチオニン、Pheはフ
ェニルアラニン、Proはプロリン、Serはセリン、Thrはトレオニン、T
rpはトリプトファン、Tyrはチロシン、Valはバリン及びXはセレノシス
テインの各残基をそれぞれ表す)で表されるアミノ酸配列もしくは当該アミノ酸
配列の部分配列を有するものである、請求項12記載の抗体。

【請求項14】 前記ペプチド断片またはペプチド断片群が血漿蛋白質に由来
するものである、請求項12または請求項13に記載の抗体。

【請求項15】 前記ペプチド断片またはペプチド断片群が、(a)分子量分画
膜に基づき10~30kDaの分子量画分に回収され、(b)イオン交換樹脂への
結合性の検討の結果、血中でpH7からpH8の間に等電点を示す構造とpH8
以上に等電点を示す構造を有し、(c)非還元系SDS-PAGEでは分子量13
~14kDaの2本のバンド及びそれらに糖鎖の付加された16~17kDaの
2本のバンドを示し、また(d)還元条件下でのSDS-PAGEでは、前記バン
ドに加えて3~4kDa、7~9kDa及び10~12kDaのバンドを呈する
ことを特徴とする、請求項12から請求項14のいずれかに記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本願発明は、新たな機能を有する蛋白質に関する。詳細には、細胞死抑制活性を有するペプチド断片またはペプチド断片群及びその精製方法並びに前記ペプチド断片またはペプチド断片群に対する抗体に関し、さらに詳細には、各種疾患例えば細胞死に関連した疾病に対する病態悪化阻止、予防または治療剤及び細胞培養における細胞死を抑制することによる有用物質生産を可能にする添加物となりうるペプチド断片またはペプチド断片群並びに前記ペプチド断片またはペプチド断片群に対する抗体に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

細胞死は、高等生物の神経系、内分泌系、免疫系における基本的な制御に重要な働きをしているばかりでなく、多くの疾病に深く関わっていることが指摘されている(Thompson C.B., Science, vol.267, p.1456-1462,(1995))。たとえば、全身性エリテマトーデスのような自己免疫疾患、神経細胞死による神経変性疾患、臓器移植に伴う臓器移植傷害等、これらはアポトーシスが関与する細胞死の影響による疾患として捉えることができる。

ところで、細胞死を引き起こす要因には外的要因と内的要因がある。外的要因としては、細胞死を促進するものとして実体的に物質として捉えられているものは、免疫系に関与するTNF(Zheng L., et al., Nature, vol.377, p.348-351,(1995))、Fasリガンド(Suda T., et al., Cell, vol.75, p.1169-1178(1993))、グルコルチコイド(Wyllie A.H., Nature, vol.284, p.555-556(1980))等があり主としてこれらに起因するもの、他にも細胞増殖に必要なエリスロポエチン、インターロイキン、神経成長因子等の増殖因子や栄養因子の欠乏によるもの等があり、生理的条件の変化によってアポトーシスによる細胞死が惹起される。さらに、放射線、温度、制癌剤、カルシウムイオノフォア、活性酸素等による非生理的なストレスが情報となってアポトーシスが誘導される場合がある。他にも、火傷、毒物、虚血、補体攻撃、溶解性ウイルス感染、過剰な薬物投与や放射線投与によりネクローシスが生じる。

内的要因としては、細胞内 Ca^{2+} 濃度、核酸代謝、アミノ酸代謝、エネルギー代謝等の代謝系の変化などがあり、これら要因により細胞を死に至らしめる。これらのアポトーシスシグナルをコントロールすることができれば各種疾患の病態悪化阻止、予防または治療に利用可能なはずであるが、機序が単純ではないため現在確認されている物質・要因の制御だけでは医療への応用は実現困難な状況にある。

【0003】

一方、現在までに確認されている細胞死を抑制する物質としては、ほとんどのアポトーシスシグナルを抑制するとされている細胞内因子である *bcl-2* や *bcl-xL* 等が知られているが (Boise L.H., et al., *Cell*, vol.74, p.597-608 (1993))、これらは細胞内に発現される必要があり細胞外に添加してもほとんど意味をなさない。それに対して、細胞外の因子としては、活性酸素によるアポトーシスを抑制するスーパーオキシドディスムターゼ(以下、SODと称することがある) (Greenlund L.J., et al., *Neuron*, vol.14, p.303-315 (1995))、カタラーゼ (Sandstrom P.A. and Buttke T.M., *Proc Natl Acad Sci USA*, vol.90, p.4708-4712 (1993))、グルタチオンペロキシダーゼ (Kayanoki Y., et al., *J. Biochem*, vol.119, p.817-822 (1996)) 等が報告されているが、これらだけで全ての細胞死を効果的に抑制することはできない。

【0004】

細胞を培養する際、主として培養細胞自身由来もしくは添加物由来の物質による細胞に対するストレスが原因で細胞死が誘導されるが、同じ条件で全ての細胞に対する細胞死が誘導されるわけではない。通常、そのような環境に適応する細胞には、ストレスによる細胞死誘導シグナルを閾値以下に保つために必要な蛋白質が、細胞内外にすでに発現されているか、新たに誘導されている筈である。それらの蛋白質としては転写因子、合成酵素、代謝酵素、酸化還元酵素、リン酸化酵素、脱リン酸化酵素、転移酵素、アポトーシス抑制蛋白等が考えられる。つまり、個々の細胞でストレスに対する感受性に差が生じるのは、それらの蛋白質の

発現量に差があるためであると予想される。そこで、細胞死の機序がそれぞれ異なるにせよ、あるストレスによる細胞死に対して抑制する因子を外から添加することにより、その細胞死誘導のシグナルを閾値以下に保つことが可能であれば、培養細胞の場合だけではなく、生体内でも同様のストレスが生じた場合に起こる細胞死を抑制することが可能と考えられる。

【0005】

細胞死と疾患には密接な関係が存在しているため、生体内の細胞死抑制効果を示す物質を数多く同定することにより多くの細胞死をコントロールすることが可能であれば、疾患の治療等、医療への応用が実現できるばかりでなく、同様に、培養細胞の効果的培養系への応用も可能となる。実際、前述のように細胞内の細胞死抑制因子として bcl-2、bcl-X 等が、細胞外の細胞死を抑制する因子としては活性酸素によるアポトーシスを抑制する SOD、カタラーゼ、グルタチオンペロキシダーゼ等が存在するが、これらの因子を細胞外に添加することにより全ての細胞死が抑制されることは難しい。それは、その作用機序の差異により、細胞死の発生過程が異なるためである。そのことを考慮すれば、種々の細胞死に対して、有意に、そしてより特異的に細胞死を抑制する活性を同定する必要がある。つまり、既知の物質により抑制を受けない細胞死に対しては、細胞死を有意に抑制する物質を探索することが必要とされている。また、生体内の細胞死抑制物質は生体の恒常性を保つ働きを有する物質として存在している可能性は高く、それらを同定する意味は大きい。

【0006】

【発明の構成】

【課題を解決するための手段】

細胞の無血清培養時もしくは特殊な条件下での培養時には、培養時のストレスにより起こるアポトーシスが度々観察される。このような細胞死が誘導される条件で細胞培養を実施し、その細胞死を抑制する活性を指標に各種クロマトグラフィー手法を用いて血液中の有効成分を精製し、細胞死を抑制する蛋白質成分を調製する。

【0007】

細胞死抑制活性を有する因子をスクリーニングするためには、細胞死を誘導する培養系を構築する必要がある。本願発明では、好適な一例としてアルブミン添加無血清培地を用いたヒト巨核芽球系の D a m i 細胞の培養系をスクリーニング方法として用いた。D a m i 細胞は RPMI 1640、D-MEM、F-12 を等量混合した培地 (0.1% BSA 及び 0.05 μ M 2-メルカプトエタノール 含) により継代可能であるが、アルブミン不含培地では殆ど増殖しない。この時、培地中に 0.01 から 0.5% のヒト血清アルブミンが存在する条件下においては細胞は正常に増殖するが、4 日目以降に全ての細胞が徐々にではなく突然死する。この培養系に活性画分の希釈試料を添加することにより細胞死抑制活性の大小を比較することが可能である。

アッセイには、D a m i 細胞の利用が最も効果的であるが特にこの細胞に限定されるものではなく、同様の条件で細胞死が生じるものであればどのような細胞を用いても細胞死抑制活性をスクリーニングすることは可能である。他にも適用可能な細胞としては、CEM、M o l t 4 等の細胞が例示される。また、このアッセイ系に用いるアルブミンは細胞死を観察できるアルブミンならどのようなアルブミンでもよいが、例えば S I G M A 社製のヒト血清アルブミン F-V は好ましい態様の一つである。

上述のアッセイ系に基づいて、体内成分とりわけ血液由来の成分に着眼し、鋭意活性探索を検討した結果、本願発明者はヒトを初めとする哺乳動物の血漿または血清中に所望の活性を見出すに至った。検出された細胞死抑制活性画分は、ヒト血漿及び血清を原料とした場合では 1600 ~ 3200 倍希釈まで細胞死抑制活性を示し、牛胎児血清を原料とした場合では 100 倍希釈以下の活性を示した。本明細書では、細胞死抑制活性を定量化する際、希釈倍率 100 以下を 0、それ以上の希釈倍率の値をそのまま活性値として表す。

【0008】

種々の検討の結果、本願発明により提供される細胞死抑制活性を有する活性物質は、セレノプロテイン P の C 末端側 103 アミノ酸配列または当該アミノ酸配列のうち 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列または前記いずれかのアミノ酸配列の部分配列を有する、ペプチド断片または

前記ペプチド断片を起源とする一連のペプチド断片群よりなることが判明した。なお、本願発明でいうペプチド断片群とは、糖鎖の有無、荷電の相違、断片化の多様性等に起因する微細構造の異なるペプチド断片の集合体を意味する。

また、その精製過程における知見により、当該ペプチド断片またはペプチド断片群は(a)分子量分画膜に基づき10kDa～30kDaの分子量画分に回収され、(b)イオン交換樹脂への結合性の検討の結果、血中でpH7からpH8の間に等電点を示す構造とpH8以上に等電点を示す構造を有し、(c)非還元系SDS-PAGEでは分子量13～14kDaの2本のバンド及びそれらに糖鎖の付加された16～17kDaの2本のバンドを示し、また(d)還元条件下でのSDS-PAGEでは、前記バンドに加えて3～4kDa、7～9kDa及び10～12kDaのバンドを呈する性状を有すること、さらに断片化された前記ペプチドにも活性が存在することが明らかになった。

【0009】

本願発明により提供される活性物質は、一般的な酵素類よりも熱、変性剤、幅広いpH、血中のプロテアーゼに対して安定であるため、これを精製同定するに際しては、種々のクロマトグラフィー工程、例えば、ヘパリンクロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー等、適用可能な種々の担体を用いた分画方法の他、硫酸アンモニウム沈殿分画、分子量膜分画、等電点分画、電気泳動分画等、種々の分画法が利用可能である。これらの分画法を組み合わせることにより、所望の細胞死抑制活性を分画することが可能である。その望ましい組み合わせの一例を実施例2に示す。態様の概略は、順に、ヘパリンクロマトグラフィー、硫酸アンモニウム沈殿分画、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ヘパリンクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー及び陰イオン交換クロマトグラフィーである。

この組み合わせにより、得られる活性画分は純度的に推定夾雑物5%以下、例えばヒト血漿を出発原料とした場合、 $2 \times 10^5 / 1 \text{ mg 蛋白質/ml}$ の活性を

示す状態で精製することが可能である。出発原料の血漿の活性が約20~40/1mg蛋白質/ml程度であるので、比活性で推定5,000~10,000倍程度上昇する。

【0010】

上述のごとく精製同定された本願発明の血漿中の細胞死抑制活性成分は、下記の性質によって特徴づけられる物質である。

①ヘパリン結合性：ヘパリンカラムへの結合性を調べると、細胞死抑制活性は弱いヘパリン結合性を示す。この知見により、本願発明の細胞死抑制活性成分は相対的に正電荷を帯びている物質であり、血球、血管内皮等血中においてストレスに曝されやすい細胞表面のヘパラン硫酸と結合することにより細胞表面の保護に関与する物質であることが予想される。

【0011】

②分子量分画膜による活性の挙動：血漿中のヘパリン結合画分について、分画分子量10kDa、30kDa、50kDaの膜により抑制活性を濃縮すると、分画分子量10kDaで90~95%、30kDaで10~20%、50kDaで0~10%の活性が回収される。このことより、本願発明の細胞死抑制活性成分は、他のヘパリン結合蛋白が存在する条件下において、その80~90%は10kDa~30kDaの分子量を示すが、一部にはそれ以上の分子量を示すこともあることから、修飾、重合、プロセシングの差に起因する分子量の異なる活性物質が一部存在することも示唆される。

【0012】

③硫酸アンモニウム分画：粗分画の試料は2M程度で全ての活性が沈殿する。ただし、厳密には、全ての活性を沈殿させるためには3M程度の硫酸アンモニウムを添加する必要がある。本願発明の活性成分は、塩析操作により他の蛋白質と共に沈することもあるが比較的塩析されにくい性質を示す。

【0013】

④イオン交換樹脂への結合性：20mM程度の適当な緩衝液を用いた場合、pH8.0以上で陰イオン交換体へ一部結合性を示すが、全ての活性が完全に結合することはない。また、pH7.0以下で陽イオン交換体への結合性を示す。この

ことから、本願発明の活性成分は血中でpH7からpH8の間に等電点を示す構造と、pH8以上に等電点を示す構造を有する物質であることが推察される。

【0014】

⑤疎水クロマトグラフィーによる分画：Macro-Prep Methyl HIC、Macro-Prep t-butyl HIC担体を用いた場合、20mM Tris(pH8.0)、200mM NaCl、1.2M硫酸アンモニウム存在下での活性画分の吸着はほとんど観察されない。1.5Mまで硫酸アンモニウム濃度を高めると3～5割が吸着され、さらに2～2.4Mまで硫酸アンモニウム濃度を高めるとほとんど全ての活性を吸着させることができる。異なる担体を用いた場合も、同様の条件により本願発明の活性成分を効果的に精製することが可能である。

【0015】

⑥ゲル濾過による分画：ヘパリン結合画分についてゲル濾過クロマトグラフィーを用いて分画した場合、分子量が30kDa～40kDaのサイズに殆どの活性が回収されるが、実際に得られる本願発明の活性物質は電気泳動で明らかに30kDa以下の分子量を示すことから、他の分子と結合しやすい可能性のある物質と予想される。

【0016】

⑦PAGE(ポリアクリドアミドゲル電気泳動)：本願発明の活性物質を未変成PAGEにより分画すると活性が単一のバンドに収束しないことから、活性物質は単一の構造ではなく、2量体の形成、荷電の違い、糖鎖の付加または本願発明の活性物質を構成するペプチド断片の断片化の形態の相違等により多様な分子量の状態で存在していることが示唆される。SDS-PAGEでは、非還元状態での電気泳動において、分子量約13～14kDaの2本のバンド及びそれらに糖鎖の付加された約16～17kDaの2本のバンドを示すペプチドにより構成されていることを確認することができる。また、還元条件では、それらに加えて約3～4kDa、約7～9kDa及び約10～12kDaのバンドが出現することから、内部にS-S結合を持つ約13～14kDa及び約16～17kDaのバンドに相当するペプチドの一部に内部切断が生じているものが存在し、還元により

S-S結合が切断され、前述の新たなサイズのペプチドが出現することを示している。このことは、約3～4 kDaのペプチド断片に対する抗体が約7～9 kDa及び約10～12 kDaのペプチド断片以外の全てのペプチド断片と反応することからも支持される。また、還元状態で得られる約3～4 kDaのペプチド自体にも細胞死抑制活性が存在することより、このペプチド部位が最も活性に関係する領域である可能性は高い。

【0017】

⑧N末端アミノ酸配列分析：上記PAGEで確認されたペプチド断片は、ヒト・セレノプロテインPのcDNAから推定されるアミノ酸配列中のC末端側103アミノ酸部分と高い相同性を示す物質であることが明らかになった。

N末端アミノ酸配列分析の結果、本願発明の細胞死抑制活性を有するペプチド断片または当該ペプチド断片と起源を同じくするペプチド断片群は、①ヒト・セレノプロテインPの260位のリジンより始まる、KR*INQLL*KLP TDSE LAPRS***H*RHLの配列、及び②ヒト・セレノプロテインPの293位のトレオニンより始まるTGSAIT*Q*KENLP SL*S*QGLRAEENIの配列を含むペプチド(*はシステインもしくはセレノシステインと推定される)を基本ユニットとしていることが判明した。本願発明の活性物質は、構成ユニットとしての前記ペプチド断片の結合体または複合体として存在し細胞死抑制活性を発揮する。一方、構成ユニットの各々にも活性が認められる。さらに、糖鎖の付加の相違、荷電の違い、また断片化の形態の相違、とりわけペプチド断片のC末端側の多様性等により多様な分子種が混在しており、混在状態においても本願発明の細胞死抑制活性を呈する。従って、本願発明の活性物質には、細胞死抑制活性を呈する限りにおいて、活性を有する個々のペプチド断片及びその部分断片のみならず、多様なペプチド断片の集合体、即ちペプチド断片群が包含される。

ところで、セレノプロテインPには本願発明で特徴づけられるサイズを有するプロセスされたフォームが存在するという報告はなく、この部位のみで活性を持つという報告もない。

【0018】

セレノプロテインPは1977年にグルタチオンペロキシダーゼ(*glutathione-peroxidase*)とは異なるセレン含有タンパク質として確認され、1982年にセレンがセレノシステイン(*selenocysteine*)の形態で取り込まれていることが明らかにされた。さらに、1991年にセレノプロテインPのcDNAのクローニングにより全長のアミノ酸配列が明らかにされ、その結果、当該蛋白質は最大10個のセレノシステインを含む可能性等が示された(Hill K.E. and Burk R.F., *Biomed Environ Sci.*, 10, p.198-208, (1997))。しかし、実際には、組換え蛋白の発現や、精製セレノプロテインPにおける本願発明中の活性ペプチド断片に相当するアミノ酸配列の同定等はなされておらず、活性部位の同定もなされていない。また、抗セレノプロテインP抗体を用いてヒトセレノプロテインPを精製したという報告もあるが、用いられた抗体がセレノプロテインPのN末端側を認識する抗体に相当するため、今回得られたペプチド断片のみの精製も不可能である。よって、本願発明で特徴づけられる活性ペプチド断片についての活性評価を行なったのは、本特許が唯一の例である。セレノプロテインPの活性としては、セレンに由来する抗酸化活性、グルタチオンペロキシダーゼ活性が報告されているが、現在までに、本願発明により得られたペプチド断片またはペプチド断片群が生体に存在し優れた活性を示すという報告はなく、当然、本願発明中に特徴づけられる活性の存在も報告されていない。つまり、完全長のセレノプロテインPに同様な活性が存在すると仮定した場合でも、活性部位は本願発明に特徴づけられる配列を有する部位に限局されることは明らかであり、本願発明中の活性ペプチド断片またはペプチド断片群の範疇に含まれる。

【0019】

その他の蛋白との活性比較：本願発明の細胞死抑制活性を示すペプチド断片またはペプチド断片群以外のセレノプロテイン及び抗酸化関連蛋白について、Dammi細胞の細胞死抑制活性の有無を相対比較すると、グルタチオンペロキシダーゼ、SODには若干の活性が観察される。しかし、本願発明の細胞死抑制活性を示すペプチド断片またはペプチド断片群と比較した場合、これらは1/100以下の活性しか示さずこの活性は無いに等しい値である。また、本願発明の活性物

質に関連性の高い完全長のセレノプロテインPとの比較では、断片化された本願発明の活性物質の細胞死抑制活性に関する顕著な優位性が認められ、「断片化」の意義の重要性が如実に示される。つまり、本願発明の活性物質は、本願発明により特徴づけられる明らかな細胞死抑制活性を示す蛋白質としては知り得る限り唯一の血中成分であり、この存在を明らかにしたことに大きな意義が存在する。

なお、上述の知見に基づき本願発明により得られたペプチド断片をリード物質として、化学合成物をデザインすることも可能である。

【0020】

前述の本願発明の細胞死抑制活性を示すペプチド断片を免疫原として用いることにより、このような新規なペプチドを認識し結合する抗体を得ることができる。本願発明のペプチド断片またはペプチド断片群を含むものであれば免疫原としての能力を有するが、実施例2で調製した画分を使用するのが望ましい。また、ペプチド合成機を用いる方法あるいは遺伝子組換え技術により大腸菌、酵母等の微生物に産生させる方法等を用いて、本願発明のペプチド断片、またはその一部に相当するペプチドを得、免疫原とすることもできる。さらに、本願発明のペプチド断片もしくはその一部をコードする遺伝子を組み込んだ動物細胞用の発現プラスミドもDNAワクチンとしての免疫原として使用可能である。そのようなペプチド断片の望ましいアミノ酸配列として、KRCINQLLCKLPTDSELAPRS*CCHCRHLIFEKTGSAIT*QCKENLPSLCS*QGLRAEENITESCQ*RLPPAA*QISQQLIPTTEASAS*R*KNQAKK*E*PSN(*はセレノシステイン)あるいはKRCINQLLCKLPTDSELAPRが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0021】

免疫する哺乳動物は限定されるものではないが、抗血清を得る場合にはウサギ等が望ましく、後に述べるモノクローン抗体を細胞融合等で得る場合にはマウスが望ましい。動物の週齢は、例えばマウスでは5～10週齢がよい。性は雌雄どちらでもよい。免疫用抗原は、例えば適当なアジュバントに懸濁させるか、または生理食塩水等に溶解して、動物の腹腔内、皮下、静脈内等に投与するのが好ま

しい。この免疫操作を2～3週間隔で1～5回行なう。最終免疫は、例えば免疫用抗原を生理食塩水に懸濁させ、動物の静脈内に投与する。このような免疫動物から採血し抗血清を調製するか、あるいは脾臓細胞を調製し、Kohler G. とMilstein Cの方法(Nature, vol.256, p.495(1975))に基づいて、抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。例えばマウスの場合、免疫したマウスの脾細胞とマウスミエローマ細胞とを細胞融合してハイブリドーマを得る。

ハイブリドーマを培養する培地としては、ハイブリドーマの培養に適した培地であればよく、一般的には、RPMI 1640培地またはEagleのMEM培地に、牛胎児血清(5～10%)、L-グルタミン(3.5～4.0 g/l)及び抗生物質(ペニシリンGやストレプトマイシン等)を添加したものが用いられる。また、ASF 104(味の素社製)、CM-B(三光純薬)等の無血清培地を用いることもできる。得られたハイブリドーマの中から、本願発明ペプチドに特異的なモノクローン抗体を産生するもののみをスクリーニングする。スクリーニングは、例えば、ハイブリドーマの培養上清を一部採取し、それが本願発明ペプチド断片またはその一部分に相当するペプチドと反応するかどうかを、EIA法あるいはRIA法、ウェスタンブロット法等の公知の方法で調べることが可能である。この方法は免疫動物の抗体の力価が上昇しているかどうかを知る方法としても使用できる。

【0022】

本願発明中の活性ペプチド断片またはペプチド断片群は生体内においてプロセスされた活性フォームとして血中で機能しており、ストレス由来により起きる細胞死を防御し、細胞の安定維持に働いていると予想される。つまり、過剰のストレスを防御しきれない場合などには細胞死が生じるはずであるから、このような時、本願発明の活性ペプチド断片またはペプチド断片群を外部から補給することが可能であれば、重篤な疾患への移行を未然に防ぐことも可能であるし、治療につなげることができる。具体的には、酸化ストレスに起因して影響を受ける疾患として、AIDS、パーキンソン病、アルツハイマー病等があり、これらの疾患の軽減に働く可能性がある。その他にも動脈硬化の原因因子として酸化LDLが

関与していることから、動脈硬化の病態悪化の阻止、治療、予防等への使用も考えられる。あるいは心筋梗塞、脳梗塞や臓器移植等再灌流傷害が観察される疾病にも有効である。その他にも、B細胞及びT細胞系の培養においても、この活性ペプチド断片またはペプチド断片群が有効に働いていることは明らかであるから、免疫細胞系の安定化、制御等を行なうことによる、免疫促進、制御薬等への応用も可能である。

また、培養細胞においても過剰のストレス由来の細胞死を防ぐことにより、有用な生体物質を産生させる場合などにおける培養条件の効率化などに利用可能である。

【0023】

また、本願発明ペプチド断片またはその一部からなるペプチド並びに当該ペプチド断片との結合能を有する抗体は、ウエスタンブロット法、ELISA法等の抗原検出系に利用することができ、診断薬を構築する材料となる。また、上記の抗体を適当な担体に結合させ、これを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、本願発明の活性を有するペプチド断片を精製することができる。さらに、B細胞及びT細胞系の培養においてもこの活性ペプチド断片が有効に働いていることは明らかであり、加えて本願発明の活性ペプチド断片の免疫時の知見による、免疫原としての活性ペプチド断片に対する抗体がB細胞に影響を与えている、との示唆を勘案すれば、免疫細胞系の安定化、制御等を行なうことによる、本願発明の抗体の免疫促進、制御薬等への応用も可能である。

【0024】

以下に、実施例を挙げて本願発明をさらに具体的に説明する。なお、以下に示す実施例では、特に断りのない限り、和光純薬、宝酒造、東洋紡およびNew England Biolabs社製の試薬を使用した。

【0025】

実施例 1

(アッセイ法)

0.05 μ M 2MEおよび0.1%BSAを含有する無血清培地SFO3(三光純薬社製)で継代可能なDami細胞(Greenberg S.M., et al.,

Blood vol. 72, p. 1968-1977 (1988)に記載: 1×10^6 cell/dish/3ml) 1mlにRPMI 1640/D-MEM/F-12の1:2:2混合培地(SA medium)を2ml添加後、3日間培養し、アッセイ時に当該細胞を回収した。細胞を50%PBS/SA/0.03%HSA(SIGMA社製)により2回洗浄し、同培地で 3×10^4 cell/mlになるように懸濁後、得られた細胞懸濁液をサンプル添加ウェルのみ200 μ l、段階希釈のためのウェルには100 μ lずつを96wellプレートに分注した。サンプル添加ウェルにアッセイ試料を2 μ l添加し攪拌後、100 μ l細胞懸濁液が入ったウェルに対して段階希釈した。37℃のCO₂インキュベーターで4から5日間培養し判定した。

アッセイの評価法としては培養4日目以降、活性のないwellの細胞は死滅し活性のあるwellの細胞は生存し続けることから、生細胞が被検試料の何倍希釈まで存在するかで評価した。

【0026】

実施例2

(細胞死抑制活性成分の精製)

以下の精製工程における活性の追跡は、すべて実施例1に記載のアッセイ法に拠った。

血漿中の細胞死抑制活性はヘパリン結合性を示す。そこで、まず、血漿中のヘパリン結合画分を集めるためにヘパリンカラムを用いた分画を行なった。ヒト血漿を出発原料とし、血漿中のヘパリン結合蛋白をヘパリンカラム(Heparin Sepharose: Pharmacia社製)に吸着させた後、0.3M塩化ナトリウムで洗浄後、2M塩化ナトリウムにより吸着画分を溶出した。目的の細胞死抑制活性の殆どは0.3M塩化ナトリウム洗浄画分に回収されるが、活性物質の精製には2M塩化ナトリウム溶出画分を用いた。

ヘパリンに結合した細胞死抑制活性の粗分画を実施するために、硫酸アンモニウム沈殿による分画を行なった。2M塩化ナトリウムヘパリン溶出画分の総量に対して31.3%W/V(約2M)の硫酸アンモニウムを添加し、沈殿物を回収した。沈殿物を水に溶解し、分子量3,500カットの透析膜を用いて水に対して透

析した。透析の完了した溶液を回収後、その総量に対して1/50量の1Mトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)を添加し、さらに、20 mMトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)を用いてOD 280の値で20~30になるように溶液濃度を調整した。この溶液から不溶物質を除去するため、1.0 μ m及び0.45 μ mの濾過フィルターを用いて濾過した。

【0027】

20 mMトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)により平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィー担体(Macro-prep High Q: BioRad社製)に、濾過済みの蛋白溶液を通液し、陰イオン交換クロマトグラフィーを実施した。この時、非吸着画分及び50 mM塩化ナトリウム溶出画分に活性が存在していたため、この画分を回収し混合した。陰イオン交換クロマトグラフィーにより得られた活性画分に対して、1Mクエン酸緩衝液(pH 4.0)と1Mクエン酸を6:4の割合で混合した溶液を総量の1/50量添加し、20 mMクエン酸緩衝液(pH 約4.0)となるように蛋白溶液を調製した。

20 mMクエン酸緩衝液(pH 4.0)により平衡化した陽イオン交換クロマトグラフィー担体(Macro-prep High S: BioRad社製)に、前述の蛋白溶液を通液し、陽イオン交換クロマトグラフィーを実施した。220 mM塩化ナトリウムを含む20 mMクエン酸緩衝液(pH 4.0)で洗浄後、550 mM塩化ナトリウムを含む20 mMクエン酸緩衝液(pH 4.0)により溶出される画分に活性が存在したため、この画分を回収した。

得られた550 mM塩化ナトリウム溶出画分の総量に対して1Mトリスアミノメタン溶液を1/30量添加し、pHを約7.5に調整した。この溶液に対して3.5M 硫酸アンモニウム溶液(1Mトリス塩酸緩衝液(pH 8.5)を1/50量添加しpHを約7.5に調整)を2/3量添加後、硫酸アンモニウム濃度が1.4M、塩化ナトリウム濃度が330 mMになるように塩濃度を調整した。さらに、不溶物質を除去するために、0.45 μ mの濾過フィルターを用いて濾過した。

【0028】

次に1.4M硫酸アンモニウム及び330 mM塩化ナトリウムを含む20 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)で平衡化した疎水クロマトグラフィー担体(Macr

o-prep Methyl HIC: BioRad社製)に前述の濾過済み蛋白溶液を通液し、疎水クロマトグラフィーを実施した。非吸着画分及び平衡化緩衝液(pH 7.5)洗浄画分に活性が存在したため、この画分を回収した。吸着画分には殆ど活性は存在しなかった。活性画分を疎水クロマトグラフィー担体に結合させるために、活性画分に対して硫酸アンモニウム濃度が2.0Mになるように上記の約pH 7.5の3.5M硫酸アンモニウム溶液を添加した。2.0M硫酸アンモニウム及び240mM塩化ナトリウムを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)により平衡化した疎水クロマトグラフィー担体(Macro-prep Methyl HIC: BioRad社製)に試料を通液し、活性成分を吸着させた。平衡化緩衝液により洗浄後、吸着している活性を20mMトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)により溶出した。回収した活性画分を水に対して1昼夜透析し、この回収した活性画分をヘパリンカラムに確実に吸着させるために、1Mクエン酸緩衝液(pH 4.5)を1/50量添加し、pHを約5.0に調整した。以上、図1参照のこと。

【0029】

20mMリン酸緩衝液(pH 6.5)(緩衝液A)及び2M塩化ナトリウムを含む20mMリン酸緩衝液(pH 6.2)(緩衝液B)を調製し、緩衝液Aで平衡化したヘパリンカラム(Hi-Trap Heparin: Pharmacia社製)にpH調整した活性画分を通液した。その後、緩衝液Bを緩衝液Aに対して5%混合した溶液(0.1M NaCl)によりカラムの2倍量洗浄した後、さらに、緩衝液Bの緩衝液Aに対して20%混合した溶液(0.4M NaCl)により溶出し、活性画分を回収した。ここで得られた活性画分を15mg/ml程度の濃度まで膜濃縮器(centriprep 3: amicon社製)により濃縮した。濃縮した活性画分の総量に対して2%の酢酸を添加後、0.45 μ mの濾過フィルターにより不溶物の除去を行なった。

【0030】

2%酢酸及び500mM塩化ナトリウムを含む溶液により平衡化したゲル濾過クロマトグラフィー担体(Superdex 200pg: Pharmacia社製)に活性画分を1ml通液し、ゲル濾過クロマトグラフィーを実施し、活性を

分画後、回収した。

0.1%トリフルオロ酢酸及び1%イソプロパノールを含む1%アセトニトリルにより平衡化したC4逆相HPLC(Wakosil 5C4-200 6mm x 150mm:Wako社製)に前述の画分を通液し、平衡化溶媒で洗浄後、0.1%トリフルオロ酢酸及び1%イソプロパノールを含む条件下で1%から40%アセトニトリルのリニアグラジエント溶出により得られた活性画分を回収した。ここまでの各精製工程における活性及び比活性の推移を表1にまとめる。

【0031】

【表1】

精製工程	蛋白濃度(mg/ml)	活性	比活性
①原料血漿	64	2400	38
②ヘパリン溶出／硫酸アンモニウム処理	22.6	12800	566
③陰イオン交換カラム、素通り画分	2.1	4800	2286
④陰イオン交換カラム、吸着・溶出	0.4	1600	4000
⑤陽イオン交換カラム、吸着・溶出	2.8	12800	4571
⑥疎水カラム、吸着・溶出	6.8	25600	3765
⑦HiTrapヘパリン、吸着・溶出	1.6	25600	16000
⑧C4逆相HPLC	0.9	204800	227556

【0032】

得られた活性画分をさらに細かく分画するためにイオン交換クロマトグラフィー担体Mini Q(Pharmacia社製)による分画を実施した。20mMエタノールアミン(pH9.15)の条件下で塩化ナトリウムによるリニアグラジエント溶出を行なった。分画された画分には全て活性が存在しており、全ての画分が後述の実施例4で得られた抗体と反応した。つまり活性物質はいくつかの構造の異なる状態で存在していることが確認された。

この段階での目的の活性物質は、電気泳動による解析の結果、非還元状態で10kDaから30kDaの数本のバンドより構成され、還元状態では3~4kDaと7~9kDaにスミアなバンドが1本、13~14kDaに2本、16~17kDaに2本の最低6本のバンドを示した。これらのバンドは全て実施例4に

示す抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検出可能であった。非還元状態での電気泳動において、28～29 kDa 近傍にも抗体に反応する蛋白が確認されることより、2量体を形成しているものも存在している可能性が示唆された。図2参照のこと

【0033】

実施例3

(活性成分のN末端配列解析)

気相シーケンサーによるアミノ酸配列解析の結果、本願発明の活性画分は、KR*INQLL*KLPTDSE LAPRS***H*RHLの配列及びTGSAIT*Q*KENLPSL*S*QGLRAEENIの配列を含むペプチドより構成されていた(*は分解により回収されなかったため、システインもしくはセレノシステインと予想される)。この画分のシーケンス解析時のアミノ酸回収量より予想されるそれぞれの存在比は1:1から2:1の範囲であった。また、この2種のペプチド以外の蛋白由来のアミノ酸の回収は5%以下であった。この2種のペプチドは還元状態でのゲル濾過クロマトグラフィー及びC4逆相HPLCにより分離されるため、S-Sにより結合しているものが存在することが予想された。

還元状態でのC4 HPLCにより分離されたペプチドの中で3～4 kDaの分子量を示すペプチドはシーケンス解析の結果、KR*INQLL*KLPTDSE LAPRSの配列を示し、7～9 kDaが大部分を占める画分は、TGSAIT*Q*KENLPSL*S*QGLRAEENIの配列を示した。また、13～14 kDa、16～17 kDaの画分もKR*INQLL*KLPTDSE LAPRSの配列を示した。これらの得られたアミノ酸配列は、下記表2に示す公表されているヒト・セレノプロテインPのcDNA配列(Hill K.E., et al., Proc Natl Acad Sci USA vol.90, p.537-541(1993))より推測されるアミノ酸配列のシグナル以降260番目のリジンより始まる断片と293番目のトレオニンより始まる断片に相当することが推察された。

【0034】

【表 2】

MWRS LGLALALCLLP SGGT シグナル配列

ESQDOSS LCK	QPPAWSIRDQ	DPKLNSNGSV
TVVALLQAS*	YLCIIEASKL	EDLRVKLKKE
GYSNISYIVV	NHQGISSRLK	YTHLKNKVSE
HIPVYQQEEN	QTDVWTLNG	SKDDFLIYDR
CGRLVYHLGL	CGRLVYHLGL	PFSFLTFPYV
EEAIKIAYCE	KKCGNCSLTT	LKDEDFCKRV
SLATVDKTVE	TPSPHYHHEH	HHNHGHQHLG
SSELS ENQQP	GAPNAPTHPA	PPGLHHHHKH
KGQHRQGHPE	NRDMPASEDL	QDLQKKLCRK
RCINQLLCKL	PTDSELAPRS	*CCHCRHLIF
EKTGSAIT*Q	CKENLPSLCS	*QGLRAEENI
TESCQ*RLPP	AA*QISQQLI	PTEASAS*R*
KNQAKK*E*P	SN(*はセレノシステイン)	

【0035】

実施例 4

(活性成分に対する抗体の作製)

実施例 2 で示された物質が、同一の物質由来のバンドであることを明らかにするために、以下に示すようにポリクローナルペプチド抗体及びモノクローン抗体を作製した。これらの抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果、電気泳動で観られる全てのバンドが同一のモノクローン抗体及びペプチド抗体により認識されることから、均一の構造ではないが全て同一の構造を持つペプチド断片であることを確認した。

【0036】

①ペプチド抗体の調製

ペプチド抗体については、還元条件下で活性画分のゲル濾過及び C4 逆相 HPLC を実施することにより 3～4 kDa のペプチドを分取し、そのアミノ酸配列解析の結果に従って 20 アミノ酸を合成し、ウサギに免疫することにより抗体を

得た。詳細には、先ず、 $H_2N-KRCINQLLCKLPTDSELAPR-COOH$ のペプチドをペプチド合成機により合成し、C18逆相HPLCにより精製した。精製したペプチドをグルタルアルデヒド法によりKLHと1:1で結合し、その200 μg をニュージーランドホワイトウサギ2匹に接種した。初免疫感作は背部皮下経路でフロイント完全アジュバント存在下1回接種し、さらに2週間毎にフロイント不完全アジュバント存在下、背部皮下経路で3回追加免疫を行ない採血した。抗血清のEIAによる免疫原との反応性は、40,000倍まで抗体価の上昇が観られた。この抗血清を出発材料としてアガロースに抗原を結合させた担体によるアフィニティー精製を行なった。得られた抗体は抗血清と同様の反応性を示した。

【0037】

②モノクローン抗体の作製

Balb/cマウスに、初免疫感作として腹腔内経路でフロイント完全アジュバント存在下で実施例2に記載の本願発明活性成分の精製画分50 μg を1回接種した後、2週間毎に腹腔内経路でフロイント不完全アジュバント存在下で2回免疫した。その1週後に静脈内経路で当該精製画分を50 μg 接種した。最終免疫から3日後に、常法に従いマウスより脾臓細胞を採取した。マウス5匹のうち、抗血清を用いたウエスタンブロットにより免疫原と反応の強かった2匹の脾臓細胞は、通常の細胞数の1/10と極端に少なく、免疫原に対する抗体がB細胞に影響を与えていることが予想された。この得られた細胞をミエローマ細胞P3X63Ag8U.1(P3U1)(ATCC寄託番号CRL-1597: Curr. Top. Microbiol. Immunol., vol. 81, p. 1 (1978))と細胞数1対1~2の割合で混合し、遠心処理(1,500 rpm、5分)して上清を除き、沈殿した細胞塊を充分ほぐした後、予め37℃に加温しておいた1 mlのポリエチレングリコール溶液(45%ポリエチレングリコール4000、55% RPMI 培地)を攪拌しながら加えた。37℃で5分間インキュベートした後、液の全量が50 mlとなるようにゆっくりとRPMI 培地を加えた。遠心分離(1,300 rpm、7分)後、上清を除去して緩やかに細胞をほぐした。これにエスクロンCM-B培地(三光純薬社製)50 mlを加え、メスピペットを用い

て緩やかに細胞を懸濁した。この細胞懸濁液を4～5枚の96ウェル細胞培養プレートの各ウェルに100 μ lずつ分注し、5%炭酸ガスを含む37℃のCO₂インキュベーター内で培養した。翌日に、HAT培地(エスロンCM-B培地にヒポキサンチン 1×10^{-4} M、チミジン 1.5×10^{-3} M、アミノプテリン 4×10^{-7} Mになるよう添加したもの)を各ウェルに100 μ lずつ分注し、5%炭酸ガスを含む37℃のCO₂インキュベーター内で培養した。ハイブリドーマのコロニーが十分生育したものからHT培地(上記HAT培地からアミノプテリンを除いたもの)に交換し、培養上清の一部を分取し、以下に述べるスクリーニング法にて目的のハイブリドーマを選別した。

【0038】

目的のハイブリドーマの選別は下記のEIA法、ウエスタン・ブロッティング法を組み合わせて実施した。

(1)EIA法

96穴のマイクロテストプレートに前記のごとく作製した合成ペプチド抗原、もしくは精製抗原(蛋白質濃度2 μ g/ml)を50 μ l/穴で加え、4℃で一晩インキュベートすることにより固相化した。さらに、1%BSA(ウシ血清アルブミン)溶液300 μ lを加え、同様にインキュベートしてマスキングを行なった。このようにして作製した抗原固相化プレートに細胞融合法によって得られたハイブリドーマおよびクローニング後のハイブリドーマの培養上清を加えて、4℃で1.5時間インキュベート後、PBSで3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン抗体溶液(カッペル社製、5,000倍希釈)を100 μ l/穴加えた。4℃で1時間インキュベート後、PBSにて5回洗浄し、その後TMB基質溶液を加え、常法により発色させその吸光度を波長450nmにて測定した。こうして精製抗原と反応するハイブリドーマクローンを選択した。この方法により、ハイブリドーマ約500個から陽性コロニーとして16個を選択した。

【0039】

(2)ウエスタン・ブロッティング法

EIAで得られた陽性コロニーについてウエスタン・ブロッティング法による

スクリーニングを行なった。精製抗原を17.5%のSDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、PVDF膜上に移行させ、膜を0.4~0.5cm幅に切断した。各細片をハイブリドーマ培養上清液に浸し、1時間37℃でインキュベートした。その後、細片をTBST(0.05% tween 含)で3回洗浄した後、アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG(TAGO社製)の1:2000希釈液中で37℃、1時間インキュベートした。TBSTで3回洗浄後、BCIP/NBTを用いる発色試薬(Bio-Rad社製)で発色させ、精製抗原の発色バンドを示すハイブリドーマを選択しクローニングした。クローニング後のハイブリドーマクローンについても同様の手法で選別した。上記の選別方法によって所望のモノクローン抗体を産生するハイブリドーマが2クローン得られた。

【0040】

実施例 5

(mini Q 活性画分のN-グリコシダーゼの処理)

活性画分の糖鎖結合の有無を確認するため、mini Qにより分画された活性フラクションについてN-グリコシダーゼFによるN型糖鎖の切断を行なった。反応は150mM Tris(pH7.4)中で実施した。その結果、明らかに、16~17kDaの2本のペプチドが13~14kDaのサイズにシフトすることを確認した。他のペプチドには大きな変化は観察されなかった。図3参照のこと。

【0041】

実施例 6

(還元カルボキシメチル化)

さらに、詳細な情報を得るために、本願発明のペプチド断片またはペプチド断片群について還元カルボキシメチル化処理後の逆相C4 HPLCによる分離を行ない、得られたペプチドについての電気泳動及びアミノ酸配列解析を実施した。電気泳動の結果、未処理の状態では7-9kDaと予想される2本のペプチドが還元カルボキシメチル化による影響で12-14kDaに相当する移動距離に変化したF3のペプチド断片及び未処理の状態で10-12kDaの分子量を示すと予想されるF2の16-18kDaの2本のペプチド断片だけがKRGINQ

LLCKLPTDSELAPRの配列よりなるペプチド断片を含んでいないことをペプチド抗体との反応性から確認した。

アミノ酸配列解析の結果、F2及びF3の画分に含まれる前記のペプチド断片はTGSAIT*Q*KENLP SL*S*Qの配列を示し、N-グリカナーゼ処理によりF2の16-18kDaのバンドがF3のバンドにシフトしていることより、F2がF3のフラグメントに糖鎖が付加したものであることを確認した。また、N-グリカナーゼ処理により分子量がシフトするペプチドの存在する画分を含めペプチド抗体で反応が観られる画分は全てKR*INQLL*KLP TDSELAPRSの配列を示した。

実施例3の結果及び上述の結果を勘案すれば、活性物質の①3-4kDa、②7-9kDa、③10-12kDa、④13-14kDa、⑤16-17kDaのバンドに相当する各ペプチド断片の中で、①、④及び⑤は260番目のリジンより始まる断片、②及び③は293番目のトレオニンより始まる断片であることが理解される。また、非還元条件では①、②及び③のペプチド断片は得られないことから、これらのペプチド断片は、元来S-Sにより結合しているユニット構造を有する④または⑤のペプチド断片が内部切断されて生じたものであることが確認された。⑤についてはN-グリカナーゼ処理により④のサイズにシフトすること、加えて①に対する抗体により認識されることより、④に糖鎖が付加したものであることが確認された。その他、糖鎖の付加によらないサイズの異なるバンドがそれぞれのサイズ近傍に確認されることから、C末端側の長さの異なるペプチドが数種存在することが推察された。図4及び図5参照のこと。

【0042】

実施例7

(他の蛋白質との活性比較)

本願発明の活性成分に属さないその他のセレノプロテイン及び抗酸化関連蛋白質の細胞死抑制活性の有無について検討した。相対比較するため、抗酸化関連セレノプロテインとしてグルタチオンペロキシダーゼ(SIGMA社製)、その他の抗酸化関連蛋白としてグルタチオンレダクターゼ(オリエンタル酵母社製)、グルタチオンSトランスフェラーゼ(SIGMA社製)、スーパーオキシドディスム

ターゼ(生化学工業社製)を用いて、D a m i 細胞の細胞死抑制活性の有無を検討した。活性測定試料としては70 μ M相当を等量用いた。アッセイの結果、グルタチオンペロキシダーゼ、スーパーオキシドディスムターゼには若干の活性が観察されたが、これらは本願発明に特徴づけられる細胞死抑制活性を示すペプチド断片またはペプチド断片群と比較した場合1/100程度の活性しか示さず、明らかに、本願発明の細胞死抑制活性を示すペプチド断片またはペプチド断片群が優位な活性を示した。図6参照のこと。

さらに、抗体アフィニティーカラムを用いて調製された完全長セレノプロテインPとの上記と同じ評価系での細胞死抑制活性の比較では、断片化された本願発明のペプチド断片またはペプチド断片群の、比活性で80倍以上という顕著な優位性が示され、「断片化」の意義を確認することができた。表3参照のこと。

【0043】

【表3】

試料	蛋白濃度(μ g/ml)	活性	比活性
完全長セレノプロテイン	40	<100	<2500
本願発明ペプチド断片	10	2000	200000

【0044】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：29

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

生物：ヒト血漿

配列

Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser

1

5

10

15

Glu Leu Ala Pro Arg Ser X Cys Cys His Cys Arg His Leu

20

25

【0045】

配列番号：2

配列の長さ：28

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

生物：ヒト血漿

配列

Thr Gly Ser Ala Ile Thr X Gln Cys Lys Glu Asn Leu Pro Ser

1 5 10 15

Leu Cys Ser X Gln Gly Leu Arg Ala Glu Glu Asn Ile

20

25

【図面の簡単な説明】

【図1】本願発明の細胞死抑制活性を有するペプチド断片またはペプチド断片群の各種精製工程での、電気泳動図(銀染色、ウエスタンブロッティング)である。

【図2】本願発明の細胞死抑制活性を有する精製ペプチド断片またはペプチド断片群の純度を示す電気泳動図(銀染色、ウエスタンブロッティング)である。

【図3】本願発明の細胞死抑制活性を有する精製ペプチド断片またはペプチド断片群のN-グリコシダーゼ処理後の挙動を示す電気泳動図である。

【図4】本願発明の細胞死抑制活性を有する精製ペプチド断片またはペプチド断片群の還元カルボキシメチル化後の挙動を示す電気泳動図(銀染色)である。

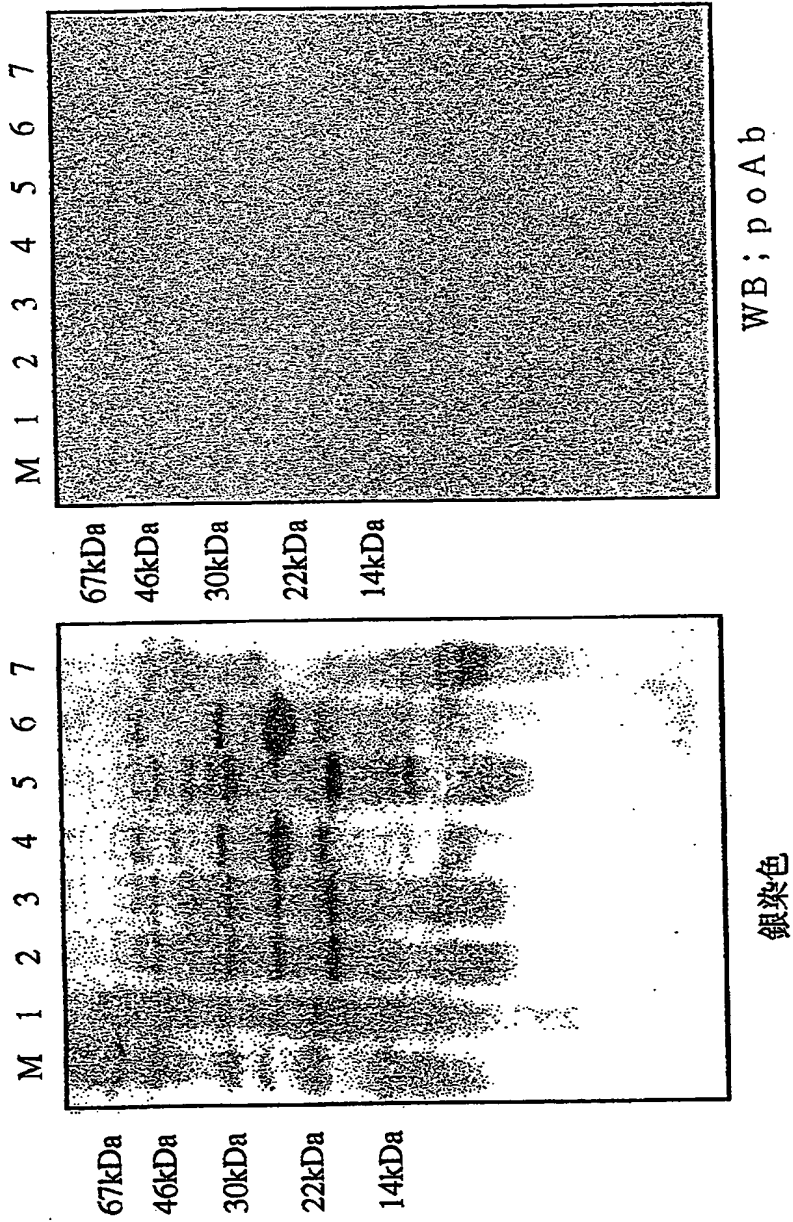
【図5】本願発明の細胞死抑制活性を有する精製ペプチド断片またはペプチド断片群の還元カルボキシメチル化後の挙動を示す電気泳動図(ウエスタンブロッティング)である。

【図6】本願発明のペプチド断片またはペプチド断片群とその他の蛋白質の、細胞死抑制活性に関する比較試験の結果を示す図である。

【書類名】

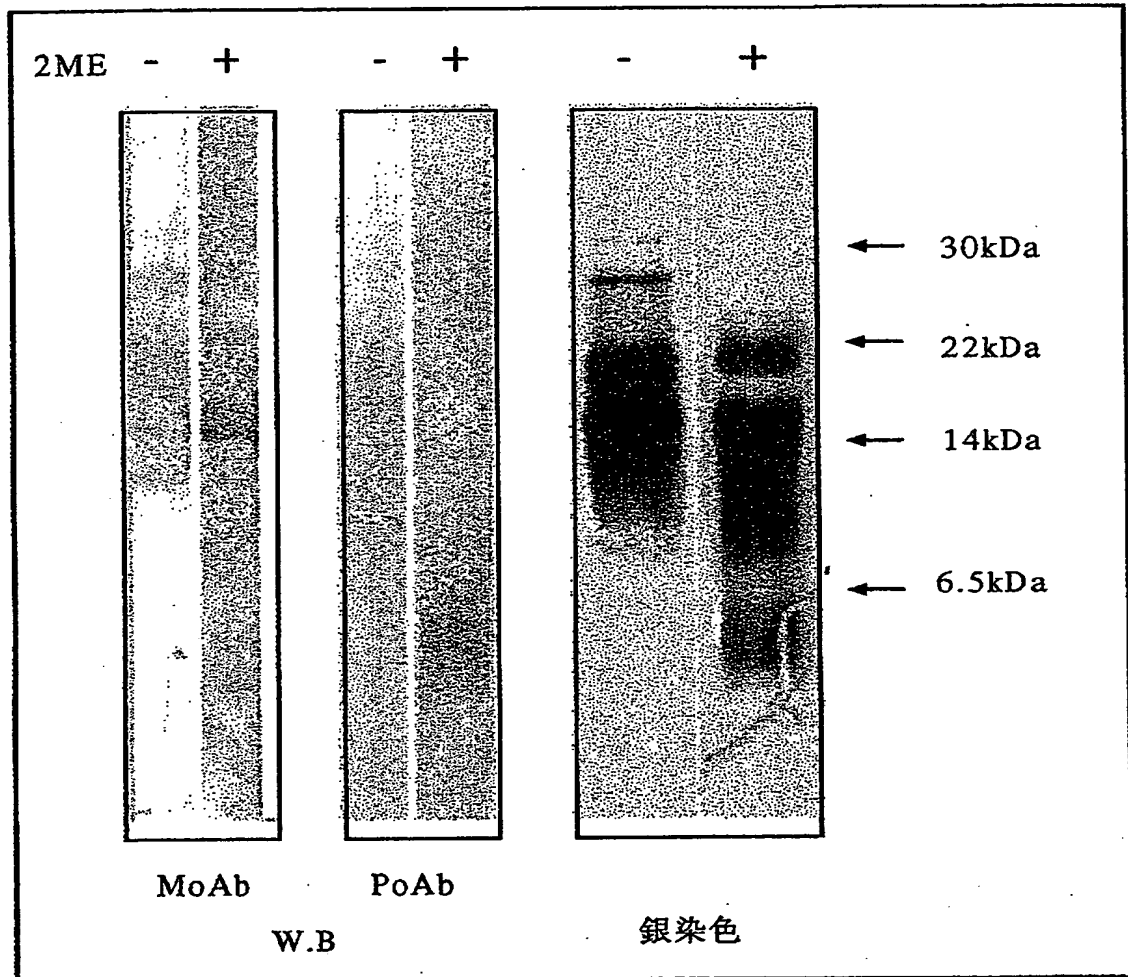
図面

【図 1】

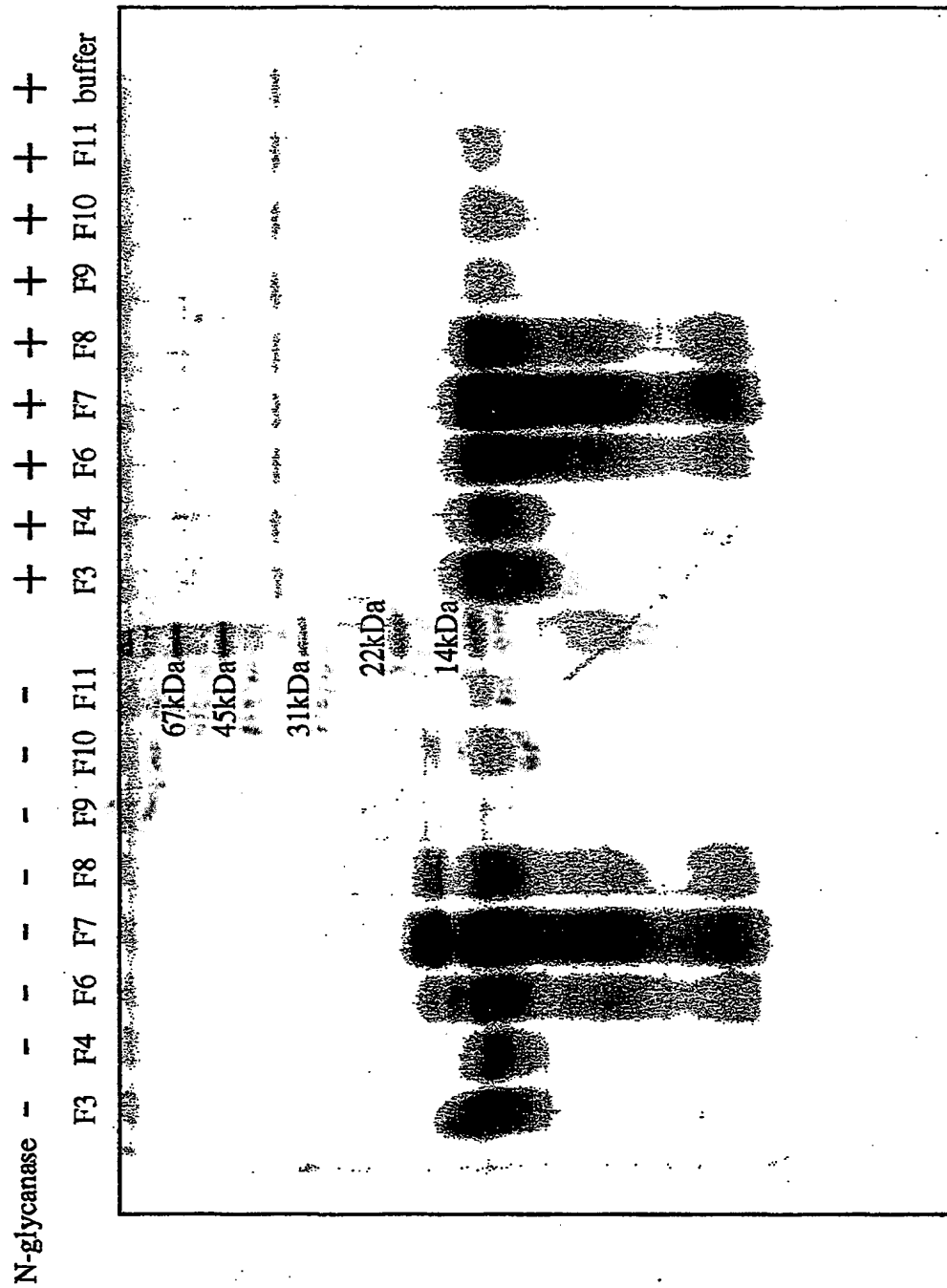


1. Macroprep High Q アプライ前試料
2. Macroprep High Q 素通り画分
3. Macroprep High Q 洗浄画分
4. Macroprep High S 0.55MNaCl溶出画分
5. Macroprep High S 1.0MNaCl溶出画分
6. 1.4M硫安存在下Macroprep Metyl HIC溶出画分
7. 2.0M硫安存在下Macroprep Metyl HIC溶出画分

【図 2】

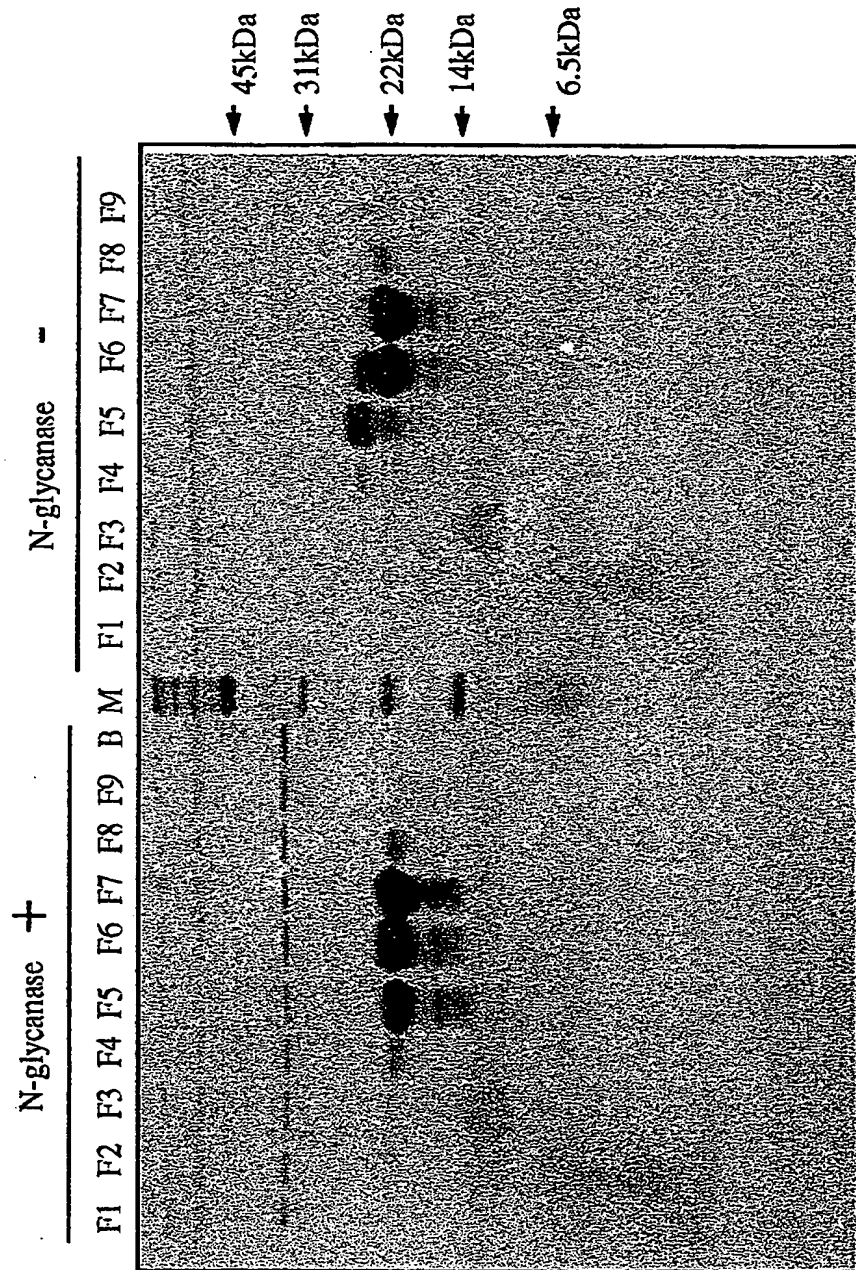


【図 3】

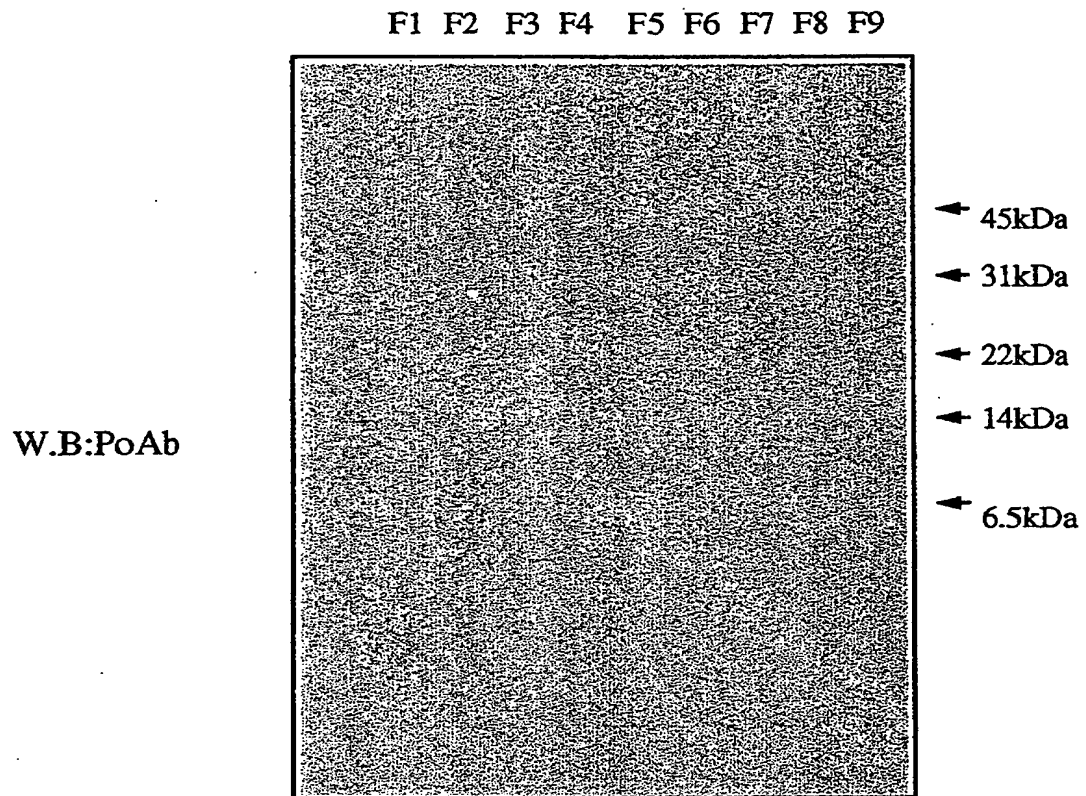


【図4】

還元SDS-PAGE 銀染色



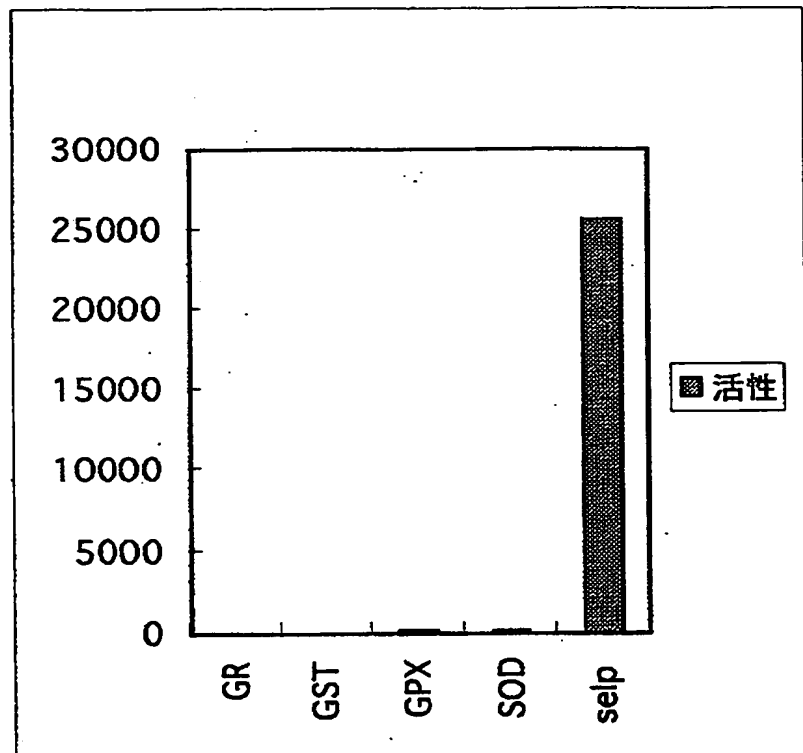
【図 5】



【図 6】

1. グルタチオンレダクターゼ (GR)
2. グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST)
3. グルタチオンペロキシダーゼ (GPX)
4. スーパーオキシドディスムターゼ (SOD)
5. セレノプロテインP 断片 (selp)

	活性
GR	0
GST	0
GPX	100
SOD	200
selp	25600



【書類名】 要約書

【要約】

【目的】 細胞死抑制活性を有するペプチド断片またはペプチド断片群及び当該ペプチド断片またはペプチド断片群に対する抗体を提供する。

【構成】 細胞死が誘導される条件で細胞培養を行ない、その細胞死を抑制する活性を指標に血漿及び血清中に細胞死抑制活性を見出し、その活性を各種クロマトグラフィー手法を用いて精製し、特異的にその活性を示す物質としてセレノプロテイン P の C 末端ペプチド断片または当該ペプチド断片群を調製する。

【効果】 本願発明の細胞死抑制活性を有するペプチド断片またはペプチド断片群は、細胞死に起因する疾患の軽減、治療、予防並びに培養細胞における有用生体物質の産生の効率化等にご利用され得る。

【選択図】 なし

【書類名】	職権訂正データ
【訂正書類】	特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】	申請人
【識別番号】	000173555
【住所又は居所】	熊本県熊本市大窪一丁目6番1号
【氏名又は名称】	財団法人化学及血清療法研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000173555]

1. 変更年月日

1996年 3月 4日

[変更理由]

住所変更

住 所

熊本県熊本市大窪一丁目6番1号

氏 名

財団法人化学及血清療法研究所